



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ :C12P 7/64, A61K 31/20
A23L 1/03

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 86/ 03518

(43) Date de publication internationale: 19 juin 1986 (19.06.86)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE85/00020

(22) Date de dépôt international: 25 novembre 1985 (25.11.85)

(31) Numéro de la demande prioritaire: 84/18393

(32) Date de priorité: 3 décembre 1984 (03.12.84)

(33) Pays de priorité: FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex (FR). UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN [BE/BE]; Halles Universitaires, 1, place de l'Université, B-1348 Louvain-La-Neuve (BE). FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE L'ETAT [BE/BE]; Gembloux, B-5800 Gembloux (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DEVIS, Raymond [BE/BE]; Place de Ninove, 9, B-1000 Bruxelles (BE). SALIBA, Rachad [LB/BE]; rue Léon Delacroix, 39, B-1070 Bruxelles (BE). THONART, Philippe [BE/BE]; rue de la Houlette, 20, B-5850 La Bruyère (BE). ARTOIS, Claude [BE/BE]; rue des Cottages, 123, B-1180 Bruxelles (BE). DIVE, Daniel [BE/FR]; Allée Dutriez, 4,

F-59650 Villeneuve d'Ascq (FR). GUILLAUME, Jean [FR/FR]; rue Jeanne d'arc, 43, F-59000 Lille (FR).

(74) Mandataires: VAN MALDEREN, Michel etc.; Freylinger & Associés, 22, avenue J.-S. Bach (Bte 43), B-1080 Bruxelles (BE).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FATTY ACIDS, PARTICULARLY γ -LINOLENIC ACID FROM TETRAHYMENA, PRODUCTS OBTAINED THEREBY AND MEDICINAL OR ALIMENTARY PREPARATION CONTAINING γ -LINOLENIC ACID OR DERIVATIVES THEREOF AS PLATELET ANTI-AGGREGATION AGENT(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS, EN PARTICULIER D'ACIDE γ -LINOLENIQUE A PARTIR DE TETRAHYMENA, PRODUITS OBTENUS ET PREPARATION MEDICAMENTEUSE OU ALIMENTAIRE CONTENANT DE L'ACIDE γ -LINOLENIQUE OU SES DERIVES EN TANT QU'AGENT ANTI-AGREGATION PLAQUETTAIRE

(57) Abstract

The process for producing fatty acids is characterized in that it comprises at least the following steps: production of ciliated protozoan tetrahymena in an appropriate nutritious medium and-extraction of total fatty acids of tetrahymena. The invention also relates to total fatty acids thus obtained, as well as to the γ -linolenic acid or the dihomogamma-linolenic acid and their derivatives as well as to medicinal or alimentary preparations containing them as platelet anti-aggregation agent or anti-thrombotic agent.

(57) Abrégé

Procédé de production d'acides gras caractérisé en ce qu'il comporte au moins les étapes de production des protozoaires ciliés Tetrahymena dans un milieu nutritif adéquat et d'extraction des acides gras totaux de Tetrahymena. L'invention porte aussi sur les acides gras totaux ainsi obtenus, ainsi que sur l'acide γ -linoléinique ou l'acide dihomogamma-linoléinique et leurs dérivés ainsi que sur des préparations médicamenteuses ou alimentaires en contenant, à titre d'agent d'antiaggrégation plaquettaire ou antithrombotique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GA	Gabon	MR	Mauritanie
AU	Australie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BB	Barbade	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	IT	Italie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali		
FR	France				

PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS, EN PARTICULIER
D'ACIDE γ -LINOLÉNIQUE À PARTIR DE TETRAHYMENA, PRODUITS
OBTENUS ET PRÉPARATION MÉDICAMENTEUSE OU ALIMENTAIRE
CONTENANT DE L'ACIDE γ -LINOLÉNIQUE OU SES DÉRIVÉS EN
05 TANT QU'AGENT ANTI-AGREGATION PLAQUETTAIRE.

La présente invention repose sur une étude approfondie de la biochimie et du métabolisme des prostaglandines chez les vertébrés supérieurs-dont l'Homme-qui a conduit à admettre la possibilité du caractère non physiologiques des prostaglandines. Celles-ci semblent n'avoir aucun rôle spécifique; elles agiraient principalement par un mimétisme inutile des hormones protidiques et certaines d'entre elles sont même dangereuses pour l'organisme, notamment la plupart de celles issues de l'acide arachidonique, dont surtout les endoperoxydes PGG₂ et PGH₂ et la thromboxane TxA₂, un de leurs métabolites, responsable d'une agrégation plaquettaire irréversible.

Or, les prostaglandines ont des précurseurs essentiellement alimentaires et donc fortuits. On peut, en principe, régler leur présence qualitative et quantitative dans l'organisme par la seule alimentation. L'absence d'acide arachidonique dans l'alimentation pourrait ainsi, théoriquement, empêcher la présence des prostaglandines dangereuses, et de leurs produits d'accompagnement.

Cependant, l'on observe que l'acide linoléique ou cis-9,12-octadécadiénoïque est lui-même transformé par l'organisme en acide arachidonique. Or, quel que soit le régime alimentaire envisagé, il est pratiquement impossible d'en éliminer toute trace d'acide linoléique, qui est d'ailleurs un acide gras "essentiel".

Le but poursuivi par la présente invention est donc de chercher un moyen de neutraliser les dangereux effets de l'acide arachidonique, dont un excès peut être responsable d'agrégaions plaquettaires irréversibles et donc de thromboses vasculaires et d'infarctus.

Les expériences de WILLIS et coll. - Prostaglandins, VIII, 509, 1974, avaient montré, chez le rat Wistar et chez le lapin New Zealand (mais non chez l'Homme), qu'un régime exempt d'acide arachidonique et riche en acide dihomog- γ -linolénique ou cis-8,11,14-eicosatriénoïque empêche l'agrégation plaquettaire. Malheureusement, ce dernier acide gras est extrêmement rare dans la nature et sa synthèse elle-même est difficile et très coûteuse (Samuelsson, dans Lipid Metabolism, ed. Wakil, S.J., Acad. Press, New York, London, p.131, 1970).

Il est apparu que le but visé par l'invention peut être atteint par un procédé caractérisé en ce qu'il comporte au moins les étapes de production des protozoaires ciliés Tetrahymena dans un milieu adéquat et l'extraction des acides gras totaux desdits Tetrahymena. Ces acides gras ne contiennent aucun individu toxique et peuvent être facilement identifiés et dosés.

Les acides gras de Tetrahymena sont caractérisés par leur richesse en acide γ -linolénique ou cis-6,9,12-octadécatriénoïque qui constitue, selon les souches et les conditions de culture 20 à 45% en poids des acides gras totaux et par la présence, entre autres, des acides oléique et ciliénique qui constituent, respectivement et selon les souches et les conditions de culture, 1 à 15% et 1 à 10% en poids des acides gras totaux.

L'hydrolyse acide des cellules de Tetrahymena, suivie d'une saponification, d'une élimination des l'insaponifiable et d'une acidification, permet d'obtenir une huile légèrement jaunâtre qualifiée de "huile de Tetrahymena" dont les propriétés d'anti-agrégation plaquettaire ont été testées et quantifiées sur une série de plasmas humains de sujets jeunes (de 25 à 35 ans) du sexe masculin.

Les résultats ont montré que cette "huile de Tetrahymena" est effectivement un agent d'anti-agrégation plaquettaire très actif.

De même, l'acide γ -linolénique, seul, présente un

effet d'anti-agrégation plaquettaire relativement moins puissant que celui du "l'huile de Tetrahymena" dont il constitue l'élément principal sur le plan quantitatif.

Le mécanisme de cet effet anti-agrégant de l'acide γ -linolénique, n'a pas encore été élucidé. À titre d'hypothèse, l'acide γ -linolénique agit en se transformant instantanément en acide dihomog γ -linolénique, dont l'effet antiagrégant est connu. Ou bien il intervient lui-même directement dans les synthèses de prostaglandines.

D'autre part, un certain effet de synergie est probablement obtenu par l'utilisation de l'acide γ -linolénique avec d'autres acides gras contenus dans l'huile de Tetrahymena, vraisemblablement, l'acide oléique et/ou ciliénique.

Ceci expliquerait l'effet anti-agrégant plus puissant de l'huile de Tetrahymena.

Il reste à souligner que l'huile de Tetrahymena est inoffensive: cette huile peut constituer un aliment ou un additif alimentaire dont l'action anti-agrégante s'oppose ainsi à celle, toujours dangereuse à la longue, des anti-agrégants "médicamenteux", comme l'aspirine et les corticoïdes.

Parmi les souches de Tetrahymena, dont on disposait celle de T.rostrata a été préférée du fait qu'elle présente, dans le milieu lait écrémé-levure ou extrait de levure utilisé, la croissance la plus rapide.

Selon l'invention, la production de Tetrahymena s'effectue en fermenteur.

Le milieu de culture préféré est constitué de lait écrémé et de levure ou d'extrait de levure.

Les conditions opératoires préférées pour une transposition à l'échelle industrielle sont :

- pH = 5.5 à 7.0
- Température : fixée ou variable entre 25 et 30°C, avec chute éventuelle à des températures plus basses au début de la phase stationnaire de croissance.

- Concentration initiale en poudre de lait écrémé : 1 à 3% (poids/volume)
- Concentration initiale en levure : 1 à 2,5% (poids/volume)
- 05 - Concentration initiale en extrait de levure : 0,5 à 1%
- Débit d'air stérile : 1 volume/minute/volume de milieu
- Vitesses périphériques des turbines variables selon la concentration en O₂ dissous. Cette vitesse est augmentée si la concentration en O₂ dissous devient inférieure à 40% de sa valeur à la saturation (fixée en absence de Tetrahymena).
- 10

L'invention concerne donc également les produits résultant du procédé précité et des préparations médicamenteuses ou alimentaires, notamment à usage diététique, contenant au moins de l'acide γ -linolénique sous forme d'acide libre ou sous forme d'un dérivé notamment sous forme d'un ester, de préférence sous forme d'un ester méthylique.

Lesdites préparations médicamenteuses ou alimentaires peuvent contenir soit directement le produit d'extraction qualifié d'huile de Tetrahymena, soit un ou plusieurs des constituants de cette huile, à savoir au moins l'acide γ -linolénique ou un dérivé de celui-ci et éventuellement d'autres constituants exerçant un effet antiagrégation plaquettaire ou d'autres effets.

On entend par dérivé de l'acide γ -linolénique également l'acide dihomog γ -linolénique et ses esters.

L'intégralité des différents acides gras peuvent être utilisés sous forme de dérivés, tels que des esters d'acides gras, en particulier les esters méthyliques.

La préparation des dérivés d'acides gras s'effectue par les procédés classiques de synthèse organique et, dans le cas particulier de la formation d'un ester par les techniques classiques d'esterification.

Les préparations médicamenteuses ou alimentaires peuvent bien entendu contenir d'autres constituants, notamment des adjuvants utiles pour l'activité souhaitée

tels que la vitamine E (acétate d' α -tocophérol).

Lorsque les préparations médicamenteuses selon l'invention sont présentées sous forme de compositions pharmaceutiques elles peuvent aussi contenir d'autres substances actives utilisables dans les compositions pharmaceutiques pour la prévention ou le traitement des affections résultant des phénomènes d'agrégation plaquettaire.

Habituellement, elles contiennent également des additifs de formulation permettant de les administrer commodément. Ces additifs peuvent être des supports ou des agents auxiliaires pharmaceutiques, solides ou liquides, organiques ou inorganiques, appropriés tels que l'eau, les solvants organiques de type paraffinique, la gélatine, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le talc, des graisses et huiles végétales et animales adéquates, la gomme, les polyalkylèneglycols ou des liants et autres agents habituels.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention contiennent en général au moins 30% en poids d'acide γ -linolénique ou l'équivalent de ses dérivés et éventuellement des substances adjuvantes.

Parmi les modes d'administration pouvant convenir, l'administration par voie orale, est préférée.

Du fait que les acides gras utilisés, constituent des aliments, il n'existe pas, en dehors de considérations diététiques, de doses maximales. Dans les proportions habituelles d'un régime alimentaire, on n'observe pas de toxicité.

Dans une thérapie faisant appel à un traitement continu, les gélules ou capsules peuvent être la forme appropriée de préparation pharmaceutique en raison des effets de longue durée ou d'effet retard obtenus lorsque le médicament est administré par voie orale.

Les dites compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées en médecine humaine par voie orale en unités de dosage contenant plus de

20% en poids d'acide γ -linoléinique ou l'équivalent de ses dérivés, avec un support non toxique acceptable en pharmacie.

05 Par "unité de dosage", on entend une dose unitaire qui peut être administrée à un patient et peut facilement être manipulée et conditionnée, en restant sous forme d'une dose unitaire physiquement stable, comprenant l'ingrédient actif soit seule, soit en mélange avec des diluants ou supports pharmaceutiques solides ou li-
10 quides.

Sous la forme d'unités de dosage, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées une à plusieurs fois par jour, à intervalles appropriés, mais toujours selon l'état du patient et en
15 fonction des prescriptions du médecin. La dose journalière appropriée des compositions selon l'invention varie en général de 20 mg à 150 mg par kg de poids corporel.

À titre d'illustration sans caractère limitatif,
20 l'invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent.

Exemple 1 : Production d'acides gras au départ de Tetrahymena.

- Souche : La souche de Tetrahymena rostrata a été four-
25 nie par Mme Fryd-Versavel (Université de Paris XI, Orsay, France).

- Milieu de culture : Composé (poids/volume) de 0,5% d'extrait de levure (Difco) et de 1% de lait écrémé en poudre (Régilait) dans de l'eau. L'addition d'un sup-
30 plément de lait (fed batch) est effectuée s'il y a lieu, à partir d'une boîte stérile de lait écrémé en poudre.

A. Description et principes de fonctionnement des fermenteurs :

On dispose de fermenteurs (Biolafitte de 20 et de
35 100 litres en acier inoxydable dont les caractéristiques dimensionnelles sont les suivants :

- fermenteur de 20 litres : fond plat ; cuve 22

7

cm de diamètre et de 55 cm de hauteur ; quatre chicanes (contrepales) perpendiculaires de 49 cm de hauteur et de 3,2 cm de largeur ; deux turbines à disque à 4 pales radiales : élévation du centre du disque de la première turbine par rapport au fond de la cuve 4,5 cm, hauteur séparant les deux turbines 11 cm, largeur des pales 2 cm, longueur des pales 2 cm, diamètre des disques 5,9 cm, diamètre des turbines 8 cm ;

- fermenteur de 100 litres : fond plat ; cuve de 43 cm de diamètre et de 78 cm de hauteur ; deux chicanes perpendiculaires de 58,5 cm de longueur et de 5,8 cm de largeur ; deux turbines à disque à 4 pales radiales : élévation du centre du disque de la première turbine par rapport au fond de la cuve 4,2 cm, hauteur séparant les deux turbines 17 cm, largeur des pales 2,5 cm, longueur des pales 3,5 cm, diamètre des disques 8,9 cm, diamètre des turbines 12,9 cm ;

La partie active des filtres d'air est une cartouche en acier inoxydable fritté d'une épaisseur de 2 mm. L'air stérile est introduit à la base des fermenteurs par l'intermédiaire d'un sparger rotatif solidaire de l'arbre d'agitation (figure 32). Les fermenteurs sont munis de systèmes automatiques de régulation, d'enregistrement et d'affichage digital du pH, de la température et de la vitesse d'agitation (en fonction de la concentration en O_2 dissous). Un ordinateur (Hewlett-Packard 9826 ; imprimante : Hewlett-Packard 2671G ; Interface ; Hewlett-Packard 6942A Multiprogramme) permet aussi la régulation, l'enregistrement et l'affichage de ces différents paramètres.

- La mesure du pH se fait par un pH-mètre (Tacussel) relié à une sonde stérilisable (Ingold) pressurisée à l'air comprimé. Des tampons, à pH 4 et 7, servent à l'étonnage. Pour le réglage du pH, à la valeur désirée, des solutions de H_2SO_4 2N reliée aux fermenteurs par l'intermédiaire de pompes péristaltiques à vitesse variable.

- L'O₂ dissous est mesuré par l'intermédiaire d'une sonde galvanique stérilisable (Biolafitte, modèle G2L). L'O₂ dissous est exprimé en pour cent : le 100% correspond à un milieu saturé en O₂ en l'absence du
05 Tetrahymena.

- La mesure de la température se fait par une sonde en platine (Biolafitte). La régulation de la température est assurée par une circulation d'eau thermostatée dans un échangeur formé par un tube aplati en
10 acier inoxydable immergé dans le milieu de culture.

Un récipient de liquide anti-mousse (Antifoam Emulsion, Sigma n° A.5758) est relié au fermenteur de 100 litres par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique qui se met en fonctionnement dès que la mousse entre en
15 contact avec un électrode réglable en hauteur. Pour le fermenteur de 20 litres, le liquide anti-mousse est ajouté mécaniquement. D'autre part, un appareil (Funda), fixé sur la platine supérieure du fermenteur de 20 litres, assure le pompage et la cassure des mousses
20 grâce à ses disques tournants.

B. Stérilisation : La stérilisation des fermenteurs contenant les milieux de culture est effectuée à 110-115°C pendant 30 minutes sous agitation. La stérilisation se fait à la vapeur, d'une façon indirecte jusqu'à 100°C, puis au-delà, avec une légère admission de
25 vapeur par le diffuseur d'air pour compenser l'évaporation et stériliser le dispositif d'étanchéité de l'arbre d'agitation et le circuit d'arrivée d'air stérile. Toutes les canalisations de raccordement sont stérilisées
30 en laissant fuser la vapeur par les purgeurs. La vapeur est introduite directement à contre-courant dans les filtres à air;

Pour les cultures en Erlenmeyer, les milieux sont stérilisés par autoclavage à 110-115°C pendant 30 minutes.
35 tes.

La solution aqueuse d'H₂SO₄2n (voir plus loin) contenue dans un Erlenmeyer est stérilisé par autoclava-

ge à 120-125°C pendant 20 minutes.

C. Cultures en Erlenmeyer : ces cultures sont effectuées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ dans le milieu base ; le volume occupé par le milieu étant inférieur à 15% du volume total de l'étalonnage.

E. Extraction des acides gras et analyse par GLC: Un culot sec de Tetrahymena est soumis à une hydrolyse acide puis à une saponification en milieu hydroalcoolique. On extrait les insaponifiables, on acidifie et on extrait les acides gras libres.

Un échantillon de ceux-ci est méthylé avec une solution de BF_3 à 20% (poids/volume) dans le méthanol.

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec, comme standard interne le nonadécanoate de méthyle et des mélanges étalons et avec une colonne de polyéthylène glycol succinate.

C. - cultures en fermenteurs : des cultures en Erlenmeyer en phase logarithmique de croissance dans le milieu de base sont utilisées pour l'inoculation. Leur volume est de 5% à 10% du volume total du milieu dans le fermenteur et la population initiale est de $5-10 \times 10^3$ cellules/ml. Pour toutes les cultures en fermenteur, on a gardé un débit d'air stérile constant et égal à 1 volume/minute/volume de milieu de culture et une température de $28 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

On a effectué les cultures dans les conditions d'agitation suivantes : la vitesse périphérique des turbines possède, pour chaque fermenteur, une valeur minimum qui s'élève à 0.94 mètre/seconde pour le fermenteur de 20 litres et à 1.69 mètres/seconde pour le fermenteur de 100 litres. Lors des cultures, la vitesse est réglée de telle sorte qu'elle garde sa valeur minimum jusqu'à ce que la concentration en O_2 dissous devient inférieure à 40%. Dans ce cas, elle augmente proportionnellement à l'écart.

D. Temps de génération et poids sec :

- La densité cellulaire est suivie par numération

10
électronique à l'aide d'un coultter counter modèle Z2
(orifice de l'électrode 200 μ m) après fixation à l'aldé-
hyde glutarique et le temps de génération est déterminé
par regression linéaire.

- 05 - Le poids sec en Tetrahymena est mesuré après
centrifugation à 800 g et à 2°C pendant 10 minutes d'un
volume déterminé du milieu de culture suivie d'une lyo-
philisation du culot humide. Ces mesures du poids sec
sont effectuées au début de la phase stationnaire de
10 croissance.

Exemple de culture effectuée et résultats obte-
nus.

Fermenteur de 20 litres

- volume utilisé : 15 litres
- 15 - pH initial = 5.5
on le laisse évoluer librement lors de la culture sans
qu'il dépasse la valeur 7.0 ± 0.1 .
- deux ajouts de poudre de lait écrémé de 1% (p/v)
chacun.
- 20 Le pH de départ est fixé à environ 5,5 par du H_2SO_4 , il
diminue d'abord légèrement probablement par suite de
l'augmentation de la concentration en CO_2 au début de la
croissance puis augmente rapidement pour atteindre la
valeur 7 où il sera fixé par le pompage automatique
25 d' H_2SO_4 2N.

Le temps moyenne de génération en minutes pour
onze essais ($n=11; \sigma=7$) est 118.

- L'ordre de grandeur de la densité cellulaire en
phase stationnaire (cellules par/ml) est de 6,9
30 ($n=11; \sigma=0,24$). Le rendement par rapport au lactose en
considérant que le poudre de lait contient 50% de lac-
tose est de 40,1%.

L'analyse des acides gras figure au Tableau 1.

- Exemple 2 : Action des acides gras de Tetrahymena
35 sur l'agrégation plaquettaire in vitro.

Le principe de la méthode de mesure

L'exploration de l'agrégation plaquettaire a été effec-

tuée par une méthode photométrique. Elle consiste à ajouter, à du plasma enrichi en plaquettes, un inducteur d'agrégation dont les plus communs sont l'ADP, l'adrénaline (ou épinéphrine) et le collagène. Lorsqu'un agent agrégant est ajouté au plasma, la transmission optique augmente avec la formation des agrégats plaquettaires et diminue lorsque survient la désagrégation. Cette méthode photométrique permet une observation qualitative et quantitative du phénomène d'agrégation et permet de déceler certaines anomalies plasmatiques ou plaquettaires qui se traduisent par une absence d'agrégation (thrombopathies) ou par une hyperagrégation (thrombophilies).

Les deux vagues d'agrégation (la réversible) et l'irréversible) peuvent être suivies avec un appareil photométrique, l'agrégomètre. Selon l'agent agrégant ajouté au plasma riche en plaquettes, l'une des deux phases peut manquer. Avec une préparation de collagène, par exemple, la première phase ou phase réversible est absente et la réponse est caractérisée par un temps de latence suivi directement de la phase d'agrégation irréversible. Avec l'ADP, les deux phases sont généralement présentes et la réponse à l'agrégomètre est donc biphasique. Mais, selon la concentration en ADP ou selon le donneur de sang, la première phase d'agrégation peut ne pas être suivie de la deuxième. Enfin, les deux phases peuvent ne pas être séparées dans le temps et ne sont alors pas distinguées à l'agrégomètre. L'incubation d'un plasma enrichi en plaquettes, avec un inhibiteur de l'une et/ou de l'autre des deux phases d'agrégation, modifie la réponse plaquettaire à l'agent agrégant : le fait est décelé à l'agrégomètre. Un anti-agrégant inhibant la deuxième phase d'agrégation, par exemple, atténue ou diminue, lors d'un test in vitro, la réponse au collagène et la deuxième courbe de la réponse à l'ADP.

Matériel et méthodes

Agrégomètre : l'agrégation plaquettaire est suivie, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, avec un appareil Born Aggregometer MK.III (du Pharmacological Research, Department of Pharmacology, Royal College of Surgeons, London - England) auquel est raccordé un enregistreur Perkin-Elmer Recorder 56. Un rayon lumineux monochromatique de 640 nm traverse une cuvette en verre siliconé (10 x 75 mm) contenant 1 ml de plasma sanguin enrichi en plaquettes (PRP). Un petit barreau magnétique, recouvert de polyéthylène et effectuant 1150 tours/minute, assure l'agitation du plasma dans la cuvette. Le PRP représente le 0% de transmission optique et un plasma pauvre en plaquettes (PPP) représente le 100% de transmission. L'addition d'un agent agrégant (ADP ou collagène) au PRP est suivie d'une variation de la transmission optique. Cette variation est enregistrée pendant 6 minutes, conformément au mode opératoire classique.

Donneurs de sang : Sept donneurs de sang du sexe masculin, âgés de moins de 35 ans, à jeûn depuis au moins 9 heures et sans aucun traitement médical.

PRP et PPP : tous les ustensiles utilisés sont en verre siliconé ou en plastique. Le sang est prélevé sur citrate : 1 volume de citrate à 3,8% (poids/volume) dans de l'eau distillée pour 9 volumes de sang.

Le PRP est obtenu par centrifugation du sang à 300 g pendant 9 minutes. Les plaquettes du surnageant sont comptées à l'aide d'un coulter counter (modèle ZF, orifice de l'électrode 70 microns) et si le nombre est supérieur à 300.000 plaquettes/mm³, il est ajusté à cette valeur par dilution avec du PPP.

Le PPP est obtenu par centrifugation du sang à 2000 g pendant 10 minutes.

Les PRP et PPP sont conservés à la température du laboratoire durant l'analyse.

Agents agrégants : De l'ADP (Boehringer) est dilué avec un tampon Michaëlis (Stago, pH = 7,3) jusqu'à

13

une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$.

05 Du collagène (Stago) est dilué avec le tampon Michaëlis jusqu'à une concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$. On incube au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes pour polymériser le collagène.

Les solutions d'ADP et de collagène sont conservées dans la glace fondante pendant l'analyse.

10 Produits testés : les produits sont dissous dans le benzène (Merck, pour analyse) et conservés sous azote jusqu'à utilisation;

- γ -linolénate de méthyle ou 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ (Sigma, n° = 5377)

15 - mélanges de γ -linolénate de méthyle et d'acétate de méthyle et d'acétate d' α -tocophérol (Roche-vitamine E).

- mélange d'acides gras de Tetrahymena rostrata dont la composition est donnée à l'exemple 1, tableau 1 ($\text{pH} \leq 7.0 \pm 0.1$).

20 - Les tests d'agrégation plaquettaire sont effectués dans les quatre heures qui suivent le prélèvement du sang.

Pour un test à blanc, on procède comme suit :

- 1 ml de PPP = 100% de transmission optique
- 1 ml de PRP = 0% de transmission optique
- 25 - addition au PRP de 50 μl de la solution d'ADP ($\rightarrow 0,25 \mu\text{g}$ d'ADP/ml de PRP) ou de 100 μl de la solution de collagène ($\rightarrow 40 \mu\text{g}$ de collagène/ml de PRP) et on enregistre la réponse pendant 6 minutes.

30 Pour chaque agent agrégant, ce test est répété à intervalles réguliers (2 à 4 fois) durant l'analyse.

Les tests de l'action d'un produit sur l'agrégation.

35 Le même procédé est utilisé, mais, dans ce cas, le ml de PRP est préalablement incubé, pendant 30 minutes et sous agitation, avec la quantité désirée du produit à tester. Le benzène dans lequel était dissous le produit, est soigneusement éliminé de la cuvette et avant incubation,

14

par un flux d'azote. Pour chaque donneur de sang, un test est effectué, au préalable, avec le résidu de l'évaporation à sec de 1 ml de benzène : les réponses obtenues sont analogues à celles obtenues avec les tests à blanc.

Expressions des résultats :

- Les résultats de l'agrégation au collagène sont exprimés par l'agrégation à 6 minutes de la vague d'agrégation unique B obtenue;

Les tests à blanc, avec 0,25 μ g d'ADP/ml, ont présenté, pour tous les donneurs, à l'exception du donneur 2, les deux vagues d'agrégation : la réversible A et l'irréversible B. Les résultats seront exprimés par l'agrégation maximum de la première vague A et par l'agrégation à 6 minutes de la deuxième vague B. Pour le donneur 2, les deux vagues ne sont pas séparées dans le temps et les résultats ont été exprimés par l'intensité de l'agrégation à 6 minutes.

Dans tous les cas, l'agrégation en première ou en deuxième phase, exprimée en %, représente la différence de transmission optique entre le PRP (0%) et respectivement le point le plus élevé de la vague A et le point atteint à la 6ème minute pour la vague B.

- Réponses normales et % d'inhibition de l'agrégation

On entend par "réponses normales", les résultats enregistrés en présence d'un agrégant, mais en l'absence de la substance à tester. Pour chaque agent agrégant, les tests "à blanc", effectués à intervalles réguliers durant l'analyse, nous permettent de calculer la réponse "normale" de chaque donneur de sang.

L'agrégation obtenue avec le même agent agrégant, mais en présence de l'un des produits testés, est comparée à celle de la réponse normale.

L'exemple suivant illustre notre méthode de calcul : pour le premier donneur du sang, deux tests "à blanc" avec 40 μ g de collagène/ml de PRP ont fourni des

agrégations à 6 minutes, ¹⁵ respectivement de 81,7% (fig.44) et de 71,7% (fig.47). La "réponse normale" au collagène est caractérisée par une agrégation de 76,7% (moyenne x des deux résultats) avec un écart-type σ de 7,1% ce qui correspond, d'après l'équation $E = \frac{\sigma \times 100}{x}$, à

$$E = \frac{7,1 \times 100}{76,7} = 9,2\%$$

Pour le même donneur de sang et avec 1 mg d'acide oléique/ml de PRP, on obtient, et pour la même concentration en agent agrégant, une agrégation de 33,7%. Le % d'inhibition de l'agrégation au collagène est donc de :

$$\frac{(76,7 - 33,7) \times 100}{76,7} = 56,1\%$$

Cette valeur est supérieure à E et est donc significative.

Résultats et discussions

Le tableau 2 fournit, pour chaque donneur de sang, la concentration des plaquettes dans le PRP et les "réponses normales" (avec les valeurs de E) au collagène (40 μ g/ml) et à l'ADP (0,25 μ g/ml).

Chacun des tableaux suivants donne, par produit testé, et sur la base des figures précédentes, les % d'inhibition des agrégations induites respectivement par le collagène et par l'ADP.

Notons que ceux-ci varient souvent considérablement, pour le même produit et pour la même concentration, d'un PRP à un autre.

35 1) γ -linoléate de méthyle (tableau 3)

Il a été constaté que le γ -linoléate de méthyle est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et inhibe préférentiellement la deuxième vague d'agrégation à

l'ADP ou la vague d'agrégation unique B au collagène.

- Avec une concentration de 1 mg/ml, l'inhibition de l'agrégation au collagène est variable d'un sujet à un autre. Mais, à cette concentration l'inhibition est
05 significative (et assez importante) chez quatre PRP (des cinq testés). L'inhibition moyenne (sur les cinq) est d'environ 42%.

Pour la même concentration, l'inhibition de la deuxième vague d'agrégation à l'ADP est présente chez
10 quatre PRP (sur les cinq testés) et la moyenne se situe à environ 55%. L'inhibition de la première vague d'agrégation est présente, mais faiblement, chez deux PRP, et est non significative chez les deux autres. Elle n'a pas pu être mesurée chez le cinquième (donneur
15 2). La moyenne (chez quatre PRP) est très peu significative et se situe à environ 10%.

- Pour une concentration de 6 mg/ml, l'inhibition de l'agrégation au collagène se situe, en moyenne, à environ 52% et seule l'agrégation d'un PRP sur quatre n'a
20 pas été inhibée d'une manière significative.

À cette même concentration, les tests d'agrégation à l'ADP montrent que la deuxième vague d'agrégation est inhibée, en moyenne (pour les deux PRP testés) d'environ 65% et la première vague est inhibée d'environ
25 29%.

On constate que l'inhibition de la vague B ne varie pas d'une manière significative en augmentant la concentration de 1 à 6 mg/ml et que, même à ces concentrations élevées, l'inhibition n'est pas totale. Pour
30 expliquer ces effets, l'hypothèse suivante peut être avancée : le γ -linolénate n'est, en lui-même, ni un substrat de la cyclooxygénase, ni un inhibiteur de celle-ci ; son action antiagrégante serait due à l'augmentation, dans les plaquettes sanguines, de la proportion d'acide dihomogamma-linoléique (antiagrégant) par
35 rapport à l'arachidonique (agrégant), deux acides dont il est le précurseur biologique. Sur la base de cette

17
hypothèse, on peut supposer que la biosynthèse du dihomom- γ -linolénique (à partir du γ -linolénique) est plus rapide que sa transformation en arachidonique et qu'un équilibre (dynamique), caractérisé par une augmentation du rapport des concentrations dihomom- γ -linolénique / arachidonique, s'installe dans les plaquettes.

La concentration en acide γ -linolénique et le temps nécessaires pour atteindre cet équilibre varient d'un sujet à l'autre. Il est possible que cette concentration puisse être inférieure à 1 mg/ml, ce qui expliquerait les réponses analogues observées avec les concentrations de 1 et de 6 mg/ml. De même, l'équilibre en question, qui suppose une réduction importante de la quantité d'acide arachidonique présente dans les plaquettes, n'élimine toutefois pas complètement cet acide. Ceci empêcherait une inhibition totale de l'agrégation.

Selon les résultats obtenus et le mode d'action proposé, on peut conclure que l'introduction, dans la nourriture, d'une source riche en acide γ -linolénique, ou l'acide lui-même, doit prévenir les maladies thrombotiques en augmentant la proportion du dihomom- γ -linolénique par rapport à l'arachidonique et en réduisant ainsi la phase d'agrégation irréversible des plaquettes face aux différents agents agrégants.

2) Mélanges de γ -linolénate et d'acétate d' α -tocophérol (tableau 4)

En mélangeant, dans la nourriture, une source riche en acide γ -linolénique (ou l'acide γ -linolénique lui-même) avec de la vitamine E, le pouvoir antiagrégant de cette source est augmenté. La vitamine E a aussi, dans le mélange, un autre rôle : empêcher comme antioxydant, la dégradation des acides insaturés dont, surtout, le γ -linolénique.

3) Acides gras totaux de Tetrahymena (tableau 5)

Ce mélange d'acides gras est, parmi toutes les

substances testées, l'antiagrégant le plus puissant.

- Pour le test au collagène, l'inhibition de l'agrégation demeure significative à une concentration de 57 $\mu\text{g/ml}$ où elle atteint une moyenne d'environ 23%.
05 À cette concentration seuls deux PRP (sur les cinq testés) n'ont pas présenté une influence significative, tandis que l'inhibition de l'agrégation d'un PRP (donneur 6, figure 59) atteignait environ 67%. En doublant cette concentration, on a, à peu près, doublé l'inhibition : celle-ci atteignait en moyenne et pour les cinq
10 PRP testés, environ 41%. À une concentration de 230 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition a atteint une moyenne de 54%, mais pour deux PRP (donneurs 5 et 6), elle était supérieure à 80% (voir les figures) à des concentrations supérieures
15 à 575 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition est, en moyenne, supérieure à 70%.

- Pour le test à l'ADP, l'inhibition de la première vague de l'agrégation n'est, en moyenne, significative qu'à partir des concentrations supérieures à 230
20 $\mu\text{g/ml}$ où elle atteint environ 15%. L'inhibition de la deuxième vague d'agrégation à l'ADP atteint environ 30% à 57,5 $\mu\text{g/ml}$, environ 50% à 115 $\mu\text{g/ml}$ et devient supérieure à 70% à partir de 575 $\mu\text{g/ml}$.

On constate que l'inhibition affecte principalement la vague B (irréversible) et qu'il faut dépasser
25 une concentration en acides gras supérieure à 230 $\mu\text{g/ml}$ pour déceler une inhibition significative de la première vague d'agrégation.

Le mélange d'acides gras de *T. rostrata* contient
30 (en poids) environ 30% d'acide γ -linolénique et environ 10% d'acide oléique. Ces deux acides, pris séparément, ne présentent que des inhibitions très faibles comparativement au mélange d'acides gras de *Tetrahymena* et la simple sommation de ces trois inhibitions par paires (en
35 tenant compte, par exemple, des teneurs respectives et des résultats des tableaux 2 et 3) ne peut, en tout cas, pas expliquer le puissant pouvoir antiagrégant du mélan-

ge. Pour tenter d'expliquer ce pouvoir, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

1. Une "synergie" existe entre l'action du γ -linoléique et celle de l'oléique et/ou du ciliénique.
- 05 2. La présence de l'acide ciliénique ($\pm 7\%$ du poids des acides gras totaux) dont l'action n'est pas connue.
3. Action d'autres acides (ou de mélanges d'acides) présents dans ce mélange (voir tableau 1; $\text{pH} \leq 7,0$
10 $\pm 0,1$).

De ces hypothèses, la première paraît la plus plausible.

On sait que l'acide oléique est un inhibiteur de la cyclooxygénase : il se fixe sur l'enzyme sans pour
15 autant être un substrat de celui-ci. Les acides dihomogamma-linoléique et arachidonique en sont, par contre, des substrats. En présence des trois acides, il y a compétition. La concentration de chacun d'eux ainsi que les affinités respectives de l'enzyme déterminent l'acide
20 de qui sera préférentiellement fixé. On peut supposer que l'affinité de la cyclooxygénase pour le dihomogamma-linoléique est la plus importante et que la compétition, en présence des trois acides, se fait principalement entre l'arachidonique et l'oléique. Dans ce cas, l'effet
25 antiagrégant dû à l'augmentation de l'acide dihomogamma-linoléique serait augmenté d'un autre effet antiagrégant : celui dû à l'inhibition par l'acide oléique de la fixation de l'acide arachidonique sur la cyclooxygénase.

L'intervention éventuelle de l'acide ciliénique
30 aurait une explication identique ou analogue.

L'inhibition de la première vague d'agrégation à l'ADP, observée pour des concentrations de mélange supérieures à $230 \mu\text{g/ml}$, est probablement due, comme on l'a souligné pour le cas du γ -linoléique, à une formation de
35 PGE_1 avant l'addition de l'agent agrégant.

Ainsi donc, le mélange des acides gras de Tetrahymena constitue en lui-même un puissant agent antiagrégant.

gant. Son pouvoir dépasse, de loin, ceux des acides
γ-linolénique et oléique pris séparément. Aucune huile
ou mélange d'acides gras connu ne présente, à la con-
naissance des Demanderesses, un effet aussi puissant sur
05 l'agrégation plaquettaire in vitro.

Tableau 1 : Composition en acides gras des *Tetrahymena* par GLC (% en poids par rapport aux acides gras totaux). Moyennes des résultats obtenus avec trois cultures (n = 3).

05		<u>Acides gras</u> Structure	T.rostrata
10		12:0 acide laurique	3,1% $\sigma = 0,9\%$
		14:0 acide myristique	5,8% $\sigma = 1,4\%$
15		16:0 acide palmitique	5,7% $\sigma = 0,8\%$
20		16:1 Δ^9 acide palmitoléique	6,3% $\sigma = 0,6\%$
		16:2 $\Delta^{6,9}$	6,1% $\sigma = 0,4\%$
25		16:2 $\Delta^{9,12}$	0,9% $\sigma = 0,2\%$
		18:0 acide stéarique	3,8% $\sigma = 0,5\%$
30		18:1 Δ^9 acide oléique	11,2% $\sigma = 0,8\%$
		18:2 $\Delta^{6,11}$ acide ciliénique	7,7% $\sigma = 0,7\%$
35		18:2 $\Delta^{9,12}$ acide linolénique	11,6% $\sigma = 0,7\%$

Suite du Tableau 1 :

05

18:3 Δ 6,9,12 acide γ -linoléinique	29,8% σ = 1,8%
20:1 Δ 11	3,8% σ = 0,3%

Tableau 2 : Concentration des plaquettes dans les PRP et réponses normales des différents donneurs de sang.

Donneur de sang	Concentration des plaquettes dans le PRP (plaquettes / mm ³) (a)	Collagène (40 µg/ml) (b)		ADP (0,25 µg/ml) (b)	
		Nombre de tests	Agrégation à 6 minutes (vague B) en % et (E)	Nombre de tests	Agrégation maximum en % de la première vague et (E) Agrégation à 6 minutes vague B en % et (E)
1	270 x 10 ³	2	76,7 (9,2)	-	-
2	365 x 10 ³	-	-	4	-(c) 58,4(10,6)
3	450 x 10 ³	4	83,4 (8,4)	4	43,1(9,3) 62,8(12,1)
4	496 x 10 ³	2	72,2 (4,8)	4	58,4(5,5) 56,7(15,3)
5	372 x 10 ³	3	84,1 (12,0)	3	67,6(10,7) 73,1(11,6)
6	370 x 10 ³	4	72,9 (8,9)	4	47,7(8,3) 76,8(8,7)
7	460 x 10 ³	4	75,6 (10,2)	4	57,3(7,2) 66,9(12,0)

(a) Les PRP qui présentent des concentrations supérieures à 300.000 plaquettes/mm³ seront ajustés à cette valeur, pour les différents tests, par dilution avec du PRP

(b) Ce tableau donne, pour chaque facteur, la moyenne des valeurs obtenues dans les tests à blanc écart-type x 100

et E = _____

valeur moyenne

(c) Pour le donneur 2, les deux vagues d'agrégation à l'ADP ne sont pas séparées dans le temps

Tableau 3 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par le γ -linolénate de méthyle (a) (b) (c)

05	$\mu\text{g/ml}$	collagène 40 $\mu\text{g/ml}$	ADP 0,25 $\mu\text{g/ml}$	
		% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur)	% d'inhibition de la vague B (donneur)
10	6000	86,0 (4)	46,7 (4)	89,4 (4)
		36,4 (5)	11,6 (5)	40,6 (5)
		86,0 (6)	-	-
		9,1 (7) (x)	-	-
15		M = 52,1	M = 29,1	M = 65,0
20	1000	42,3 (1)	-	-
		-	-(2)	42,5 (2)
		76,7 (4)	24,7 (4)	88,2 (4)
		24,5 (5)	8,4 (5) (x)	10,9 (5) (x)
25		68,2 (6)	7,3 (6) (x)	75,2 (6)
		10,0 (7) (x)	15,4 (7)	67,1
		M = 42,3	M = 10,0	M = 54,6

(x) % d'inhibition non significatifs

30 (a) N.S. = valeurs non significatives sur la base des valeurs de E du tableau 1.

(b) M = moyenne des valeurs (les valeurs non significatives sont considérées comme nulles). M est non significative si elle est inférieure ou égale à la moyenne des E.

35

(c) Pour le donneur 2, les deux vagues d'agrégation à l'ADP ne sont pas séparées dans le temps et on mesure seulement l'inhibition de l'agrégation à 6 minutes.

25

Tableau 4 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par les mélanges de γ -linolénate de méthyle et d'acetate d' α -tocophérol (a) (b) (c).

05	collagène 40 μ g/ml		ADP 0,25 μ g/ml	
10	μ g/ml	% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur)	% d'inhibition de la vague B (donneur)
15				
20	Acétate : 142 γ -linolé- nate : 1000	84,3 (4) 85,0 (5) 83,7 (6) M = 84,3	38,3 (4) 37,7 (5) - M = 38	83,9 (4) 73,3 (5) - M = 78,6
25				
30	Acétate : 71 γ -linolé- nate : 1000	79,6 (1) - 82,1 (5) 71,2 (6) 9,1 (7)(x) M = 58,2	- - 36,3 (5) 15,4 (6) 43,3 (7) M = 31,7	- 59,9 (2) 72,3 (5) 84,2 (6) 86,8 (7) M = 75,8
35				

(x) % d'inhibition non significatifs

(a) (b) (c) : voir notes tableau 3.

05

		collagène 40 µg/ml	ADP 0,25 µg/ml	
	µg/ml	% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur).	% d'inhibition de la vague B (donneur)
05				
10				
15	2300	92,5 (1) - 86,7 (4) M = 89,6	- - 100 (4)	- 93,3 (2) 79,5 (4) M = 86,4
20	1150	81,1 (3) 86,3 (4) 88,6 (5) 89,8 (6) 59,7 (7) M = 81,1	85,7 (3) 40,4 (4) 75,8 (5) 80,9 (6) 43,3 (7) M = 65,1	100 (3) 76,0 (4) 85,4 (5) 83,8 (6) 87,3 (7) M = 86,9
25	575	69,7 (3) 84,9 (4) 91,0 (5) 89,8 (6) 28,6 (7) M = 72,8	45,3 (3) 43,3 (4) 22,8 (5) 30,5 (6) 41,5 (7) M = 36,7	84,3 (3) 78,7 (4) 47,9 (5) 92,1 (6) 67,5 (7) M = 74,1
30				
35	230	28,6 (3) 55,9 (4) 88,0 (5) 84,5 (6) 13,4 (7) M = 54,1	11,4 (3) 13,3 (4) 6,9 (5)(x) 16,6 (6) 35,4 (7) M = 15,3	44,5 (3) 81,7 (4) 10,1 (5) 86,3 (6) 55,5 (7) M = 53,6

Suite du Tableau 5 :

05	115	12,4 (3)	-	-
		33,0 (4)	11,2 (4)	77,7 (4)
		77,6 (5)	6,0 (5)(x)	3,2 (5)(x)
		83,7 (6)	2,7 (6)(x)	78,4 (6)
		-2,5 (7)(x)	20,6 (7)	44,3 (7)
		M = 41,3	M = 7,9 (x)	M = 50,1
10	57,5	4,3 (3)(x)	8,7 (3)(x)	12,3 (3)
		15,2 (4)	4,0 (4)(x)	49,0 (4)
		31,9 (5)	2,8 (5)(x)	0,2 (5)(x)
		67,4 (6)	1,0 (6)(x)	69,0 (6)
		-1,9 (7)(x)	15,8 (7)	21,9 (7)
		M = 22,9	M = 3,2 (x)	M = 30,4
15				

(x) % d'inhibition non significatifs

(a) (b) (c) : voir notes tableau 3.

REVENDICATIONS.

1. Procédé de production d'acides gras caractérisé en ce qu'il comporte au moins les étapes de
 - culture en masse des protozoaires ciliés Tetrahymena dans un milieu nutritif adéquat et
 - l'extraction des acides gras totaux de Tetrahymena.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on utilise l'espèce T.rostrata de Tetrahymena.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la production de Tetrahymena s'effectue en fermenteur en utilisant un milieu de culture à base de lait écrémé et de levure ou d'extrait de levure.
4. Produit obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Produit selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il est constitué à raison d'au moins 20% d'acide γ -linolénique ou d'acide dihomog γ -linolénique ou de ses dérivés, éventuellement mélangé avec 1 à 15% en poids d'acide oléique et 1 à 10% d'acide ciliénique.
6. Produit selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il contient l'acide γ -linolénique ou l'acide dihomog γ -linolénique sous forme d'acide libre ou sous forme d'un dérivé notamment d'ester, de préférence un ester méthylique.
7. Préparation médicamenteuse ou alimentaire à action d'antiagrégation plaquettaire ou antithrombotique caractérisée en ce qu'elle contient comme constituant actif au moins de l'acide γ -linolénique ou l'acide dihomog γ -linolénique ou ses dérivés, notamment ses esters, de préférence l'ester méthylique.
8. Préparation médicamenteuse ou alimentaire caractérisée en ce qu'elle contient l'acide γ -linolénique en mélange avec de l'acide oléique et/ou de l'acide ciliénique.
9. Préparation médicamenteuse ou alimentaire selon la revendication 7 ou 8 caractérisée en ce qu'elle comporte comme adjuvant l'acétate d' α -tocophérol.

10. Préparation médicamenteuse ou alimentaire à action d'antiagrégation plaquettaire ou antithrombotique caractérisée en ce qu'elle contient le produit selon la revendication 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/BE 85/00020

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.⁴ C 12 P 7/64; A 61 K 31/20; A 23 L 1/03 F

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched *

Classification System

Classification Symbols

Int.Cl.⁴

C 12 P

A 61 K

C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Chemical Abstracts, vol. 101, no. 3, 16 July 1984, Columbus, Ohio (US) R.L. Conner et al.: "Fatty acid desaturase specificity in Tetrahymena", see page 335, no. 20337x & Lipids 1984, 19 (4), 285-8, see abstract	1,4-6
X	Chemical Abstracts, vol. 92, no. 11, 17 March 1980, Columbus, Ohio, (US) P.B. Schick et al.: "The effect of temperature on unsaturated fatty acid loss in tetrahymena pyriformis", page 274, no. 90596a & Biochim. Biophys. Acta 1979, 575 (3), 475-8, see abstract	1,4-6
X	Chemical Abstracts, vol. 86, no.9, 28 February 1977, Columbus, Ohio (US) M.J. Koroly et al.: "Unsaturated fatty acid biosynthesis in tetrahymena. Evidence for two pathways", page 197, no. 52528y & J. Biol. Chem. 1976, 251 (23), 7588-92, see abstract	1,4-6
X	Chemical Abstracts, vol. 84, no. 84 no. 19, 10 May 1976, Columbus, Ohio (US) R.L. Conner et al.: "The effect of temperature on the fatty-acid composition of tetrahymena pyriformis", page 225, no. 132385y	

* Special categories of cited documents: ¹⁴

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international
filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or
which is cited to establish the publication date of another
citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or
other means

"P" document published prior to the international filing date but
later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date
or priority date and not in conflict with the application but
cited to understand the principle or theory underlying the
invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention
cannot be considered novel or cannot be considered to
involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention
cannot be considered to involve an inventive step when the
document is combined with one or more other such docu-
ments, such combination being obvious to a person skilled
in the art.

"A" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

27 May 1986 (27.05.86)

Date of Mailing of this International Search Report

12 June 1986 (12.06.86)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

-2-

A	& J. Protozool. 1976, 23 (1), 193-6, see abstract DE, A, 2749492 (BIO-OIL RESEARCH) 11 May 1978, see claims; page 12, lines 15-18	1,4-6 10
A	GB, A, 2084172 (ROUSSEL UCLAF) 7 April 1982, see claims; pages 1,2	10
A	EP, A, 0068854 (HORROBIN) 5 January 1983, see claims	10

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

- see annex

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

1-6,10.

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	<p data-bbox="407 300 967 327">VI. Observations in case of non-unity of invention</p> <hr data-bbox="407 342 992 346"/> <p data-bbox="407 384 1230 470">-Claims 1-6,10: Process for producing fatty acids by culture of protozoans product obtained by their process and medicinal preparation containing this product</p> <p data-bbox="407 499 1153 583">-Claims 7-9 : Medicinal or alimentary preparation containing as its active constituent gamma-linolenic acid or dihomogamma-linolenic acid or their derivatives (known products)</p>	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO.

PCT/BE 85/00020 (SA 11393)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 09/06/86

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A- 2749492	11/05/78	GB-A- 1580444	03/12/80
GB-A- 2084172	07/04/82	FR-A, B 2490631	26/03/82
		NL-A- 8104348	16/04/82
		DE-A- 3138088	06/05/82
		JP-A- 57091915	08/06/82
		FR-A, B 2514346	15/04/83
		US-A- 4407821	04/10/83
EP-A- 0068854	05/01/83	US-A- 4386072	31/05/83
		AT-B- E11222	15/02/85
		CA-A- 1193965	24/09/85

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/BE 85/00020

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB⁴ : C 12 P 7/64; A 61 K 31/20; A 23 L 1/03F		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB⁴	C 12 P A 61 K C 12 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	Chemical Abstracts, volume 101, no. 3, 16 juillet 1984, Columbus, Ohio, (US) R.L. Conner et al.: "Fatty acid desaturase specificity in Tetrahymena", voir page 335, no. 20337x & Lipids 1984, 19(4), 285-8, voir résumé	1,4-6
X	Chemical Abstracts, volume 92, no. 11, 17 mars 1980, Columbus, Ohio, (US) P.B. Schick et al.: "The effect of temperature on unsaturated fatty acid loss in tetrahymena pyriformis", page 274, no. 90596a & Biochim. Biophys. Acta 1979, 575(3), 475-8, voir résumé	1,4-6
X	Chemical Abstracts, volume 86, no. 9, 28 février 1977, Columbus, Ohio, (US) M.J. Koroly et al.: "Unsaturated fatty acid biosynthesis in tetrahymena. Evidence for two pathways", page 197, no. 52528y & J. Biol. Chem. 1976, 251(23), 7588-92	./.
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après celle date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 27 mai 1986		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">12 JUN 1986</div>
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;"> L. ROSSI </div>

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE

	voir résumé	1,4-6
X	Chemical Abstracts, volume 84, no. 19, 10 mai 1976, Columbus, Ohio, (US) R.L. Conner et al.: "The effect of temperature on the fatty-acid composition of tetrahymena pyriformis", page 225, no. 132385y & J. Protozool. 1976, 23(1), 193-6, voir résumé	1,4-6
A	DE, A, 2749492 (BIO-OIL RESEARCH) 11 mai 1978, voir revendications; page 12,	10 ./. .

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE

Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications numérotées se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☐ Les revendications numérotées se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, précisément:

3. ☐ Les revendications numérotées sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et à la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

- voir annexe

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme seulement une partie des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
3. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numérotées: 1-6, 10.

4. ☐ Etant donné que toutes les revendications susceptibles de faire l'objet d'une recherche le pouvaient sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucune taxe additionnelle.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
- ☐ Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)	
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷		N° des revendications visées ¹⁸	
	lignes 15-18			
A	GB, A, 2084172 (ROUSSEL UCLAF) 7 avril 1982, voir revendications; pages 1,2		10	
A	EP, A, 0068854 (HORROBIN) 5 janvier 1983, voir revendications		10	

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUÉS SUR PCT/ISA/210 (feuille suppl. 2)

VI. Observations lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention

- revendications 1-6,10: Procédé de production d'acides gras par culture de protozoaires, produit obtenu par ce procédé et préparation médicamenteuse contenant ce produit

 - revendications 7-9 : Préparation médicamenteuse ou alimentaire contenant comme constituant actif de l'acide gamma-linolénique ou de l'acide dihomogamma-linolénique ou ses dérivés (produits connus)
- - -